Die Bedeutung der Spurenelemente für Chlorella

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
genehmigt von der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

von

Günther Stegmann
aus Gütersloh

Mit 13 Abbildungen im Text

Jena
Verlag von Gustav Fischer
1940

N 35

Die Bedeutung der Spurenelemente für Chlorella

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
genehmigt von der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

von

Günther Stegmann
aus Gütersloh

Mit 13 Abbildungen im Text

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Dezember 1939
Tag der Promotion: 30. Juni 1940.

Jena
Verlag von Gustav Fischer
1940

Referenten: Professor Dr. Kurt Noack
Professor Dr. Ludwig Diels

Sonderabdruck aus „Zeitschrift für Botanik", 35. Band, Heft 10
Herausgegeben von Prof. Dr. Kurt Noack, Prof. Dr. Friedrich Oehlkers
u. Geh. Hofrat Prof. Dr. Friedrich Oltmanns
Verlag von Gustav Fischer in Jena

Einleitung.

Wenn es sich darum handelt, die Wirkung der Spurenelemente oder wie diese sonst genannt werden mögen, im einzelnen zu erforschen, so ist es erforderlich, auf einfach gebaute Pflanzen zurückzugreifen, wie sich dies ja auch bei der Untersuchung der Einzelvorgänge bei inneren Stoffwechselprozessen als nötig erwiesen hat. Denn wenn auch zum Teil höchst exakte Versuche über die Bedeutung der Spurenelemente für die höheren Pflanzen vorliegen, so beziehen sich diese doch im wesentlichen auf die Allgemeinwirkung und wenige äußerliche, allerdings oft spezifische Mangelsymptome, während die Untersuchung von Elementarfunktionen des Plasmas an die Verwendung einfach gebauter Pflanzen gebunden ist, die ja mit den Versuchen von Raulin (1869) mit Zink an Schimmelpilzen auch an der Wiege der Spurenelementforschung gestanden haben und bei denen keine Überlagerung der greifbaren, halbwegs primären Spurenelementwirkungen durch Vorgänge im Stofftransport, im Wasserhaushalt u. dgl. zu befürchten ist.

Die vorliegenden Versuche wurden an *Chlorella vulgaris* var. *pyrenoidosa* vorgenommen, deren innerer Stoffwechsel durch Warburg, Genevois und Gaffron weitgehende Klärung erfahren hat.

Die Arbeiten, die sich mit der Wirkung von Spurenelementen auf niedere Algen befassen, sind nicht sehr zahlreich. Roberg

(1930—32) hat die Wirkung von Eisen, Zink und Kupfer auf *Chlorella* und *Scenedesmus* und einige andere Grünalgen in Anlehnung an die alten Versuche mit *Aspergillus* untersucht und geringe Förderung des Wachstums durch Zink und auch Kupferzusatz gefunden. Hopkins (1934) fand bei Versuchen mit *Chlorella* in Glaskolben nur Mangan wirksam; er erhielt keine Förderung, wenn er statt Mangan Zink, Bor oder zahlreiche andere Elemente einzeln zugab. Nach Young (1935) wird bei *Chlorella* und *Crucigenia* durch verschiedene Spurenelemente (Al, B, Ba, Mn, Ni, Sr, Zn) das Wachstum mehr oder minder verstärkt; doch sind seine Angaben größtenteils qualitativer Art, so daß man sich kein genaues Bild von der Wirkungsweise der einzelnen Spurenelemente machen kann. Güntzesco und Peterfi (1936) fanden, daß Zink eine bessere Zellentwicklung bei der Chaetophoracee *Microthamnium Kützingianum* Naeg. hervorrief, während Mangan die Zellteilung stimulierte.

Ein gewisser Schwerpunkt in der Erforschung des Mineralstoffwechsels der Grünalgen liegt in den Zweifeln, die hinsichtlich des Calciumbedürfnisses bestehen. So sollen nach Benecke (1898), Loew (1925), Pringsheim (1926) und Warén (1936) bestimmte Formen ohne Calcium auskommen. Bei *Chlorella* haben die Calciumfrage Schramm (1922), Hopkins und Wann (1926), Pirson (1937) wie auch Trelease und Selsam (1939) berührt und sind teilweise von der Entbehrlichkeit des Calciums für *Chlorella* überzeugt.

Wir prüften, welche Spurenelemente, die in der von Hoagland eingeführten Zusatz-Nährlösung enthalten sind, für *Chlorella* in erster Linie notwendig sind und behandelten auch die Frage des Calciumbedarfs bei dieser Alge. Hierbei wurde größtmögliche Reinheit erstrebt, da diese in den bisherigen Versuchen meist zu wünschen übrig ließ. Wir erhielten dadurch und durch einige andere Maßnahmen weit stärkere Kontraste zwischen Normal- und Mangelkulturen, als sie bisher erzielt wurden und konnten zeigen, daß für *Chlorella*, abgesehen von Eisen und Mangan, Z i n k lebenswichtig ist, eine Borwirkung nicht nachweisbar ist und C a l c i u m die Bedeutung eines Spurenelementes besitzt.

Methoden.

1. Umkristallisation der Salze und Reinigung der Gefäße.

Zur Reinigung der Grundnährsalze stehen die Methoden der Umkristallisierung [Molisch (1894), Benecke (1895, 1907 I)] und die der Adsorption der Verunreinigungen an Kohle, Calciumkarbonat oder Tricalciumphosphat [Steinberg (1919), Roberg (1928)] zur Verfügung. Obwohl gerade bei *Chlorella* Hopkins und Wann (1927) und Hopkins (1930, 1934) gute Erfolge mit der Adsorption an Tricalciumphosphat erzielten, reinigten wir mittels Umkristallisierung, da damit das infolge der Anwendung von Adsorptionsmitteln mögliche Auftreten neuer Verunreinigungen vermieden war [vgl. Sakamura (1936), Roberg (1928, 1931)].

Das von der Firma Schering gelieferte doppelt destillierte Wasser wurde einer Destillation nach Fitting (1927) über Jenaer Glas unterworfen und unmittelbar darauf in einem Quarzdestillationsapparat (Heraeus), dessen sämtliche Teile aus durchsichtigem Quarz bestehen, nochmals destilliert. Für alle Versuche wurde nur dieses »Quarzwasser«, das selbstverständlich auch in Quarzgefäßen aufbewahrt wurde, in frischem Zustand verwandt, um Verunreinigungen durch längeres Stehenlassen und evtl. hineinfallende Staubteilchen von vornherein zu verhindern. Diese Vorsichtsmaßregel erwies sich im Laufe der Arbeit als notwendig.

Als Ausgangsmaterial für die Umkristallisation dienten die reinsten, im Handel erhältlichen Salze von Merck: KNO_3, $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, KH_2PO_4, $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$, $Ca(NO_3)_2$, die zunächst in Jenaer Geräteglas 20 mit dem über Glas destillierten Wasser und dann noch zweimal mit Quarzwasser in Quarzgefäßen umkristallisiert wurden. Die Salze bewahrten wir in Quarzschalen aus undurchsichtigem Quarz unter staubsicherem Glasverschluß und, soweit hygroskopisch, im Exsiccator auf. Von Calciumnitrat und Manganchlorür wurde außerdem eine Stammlösung in Quarz-Erlenmeyer-Kolben vorrätig gehalten. Weiterhin kam Borsäure von E. de Haen (garantiert reine Reagenzien), Kupfersulfat, Zinksulfat und Kadmiumchlorid pro analysi von Merck zur Anwendung. Das verwendete

Fe-Salz (Eisenglyzerinphosphat, s. S. 8) wurde keiner besonderen Reinigung unterworfen.

Die Hauptversuche wurden in 300-ccm-Erlenmeyer-Kolben aus durchsichtigem Quarz (Heraeus) mit Quarzröhren zum Lufteinleiten (Watteverschluß) ausgeführt. Es standen etwa 40 Quarzkolben bei den Hauptversuchen zur Verfügung.

Das Kulturmedium kam, auch bei Herstellung der Nährlösungen, bei der das Abfüllen mittels Quarzmensur geschah, nur mit Quarz in Berührung; lediglich die Ca-, Zn-, Mn-, Fe-Zusätze wurden aus besonders für diesen Zweck bereitgehaltenen 1-ccm-Pipetten aus Glas zugegeben.

Als Parallelversuche setzten wir (s. u.) Kulturen in Neutralglas und auch Jenaer Geräteglas 20 an. Um eine sorgfältige Reinigung der Kolben zu gewährleisten, wurden diese stets mindestens 24 Stunden mit Chromschwefelsäure behandelt, nach Spülen in Leitungs- und gewöhnlichem destillierten Wasser ausgedämpft, mit über Glas destilliertem Wasser und Quarzwasser gespült, mit letzterem bis zu ⅓ gefüllt und einige Tage unter 2—3maligem Wasserwechsel stehengelassen, wobei sie noch 2mal ausgekocht wurden.

2. Kulturmethode in Nährlösung.

Die *Chlorella* wurde auf Agar mit anorganischer Nährlösung (s. u.) in Jenaer Reagensgläsern gezüchtet [vgl. Pirson (1937)]. Die Anzucht in den Nährlösungskulturen erfolgte an einer Beleuchtungs- und Durchlüftungsanlage bei Dauerbelichtung [vgl. Pirson (1940)]. Um in den Nährlösungskulturen ständig gleichmäßigen Wachstumsverlauf zu erzielen, war es notwendig, die Kulturen täglich umzuschütteln [2mal, vgl. van Hille (1938)] und zum Impfen stets junge Agarkulturen zu verwenden, die ebenfalls dauernd der starken Beleuchtung ausgesetzt waren. Bei älteren Agarkulturen, die sehr dicht geworden sind, können sich ungünstige Wachstumserscheinungen bemerkbar machen. Ferner ist für gleichbleibende Temperatur durch Regulierung des durch die Kühlmäntel der Lampen gehenden Wasserstromes zu sorgen.

Als Stamm-Nährlösung diente eine Nährlösung, die in An-

lehnung an Hopkins und Wann (1926) und Pirson (1937) hergestellt war:

KNO_3	$1{,}5 \cdot 10^{-2}$ mol
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	$1{,}5 \cdot 10^{-3}$ „
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4\,H_2O$	$3 \cdot 10^{-4}$ „
KH_2PO_4	$3 \cdot 10^{-2}$ „
$Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$	$3 \cdot 10^{-3}$ „
$FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$	$4 \cdot 10^{-5}$ „
$MnCl_2 \cdot 4\,H_2O$	$1 \cdot 10^{-6}$ „

Sie reagiert schwach sauer ($p_H = 5{,}8$), ist fast niederschlagsfrei (wenig Ca) und hat den Vorzug, ihren p_H-Wert während der Hauptkulturperiode ohne Anwendung übermäßig großer Phosphatmengen annähernd beizubehalten. Die Konstanthaltung des p_H-Wertes spielt eine große Rolle, da unter Umständen ein p_H-Effekt die Wirkung eines Spurenelementes verdecken bzw. vortäuschen kann [vgl. Pirson (1937)]. Infolgedessen wurden auch die p_H-Werte variiert, nachdem in eigenen Versuchen die von Wann und Hopkins (1927) festgestellte Toleranz von *Chlorella* gegenüber p_H-Werten von 5 bis über 7 bestätigt werden konnte. Die Anwendung von 0,03 mol KH_2PO_4 ergab einen Anfangs-p_H-Wert von 4,5 in der Nährlösung; 0,012 mol KH_2PO_4 + 0,022 mol Na_2HPO_4 machten die Nährlösung ungefähr neutral. Wichtig ist hierbei die Eisenversorgung, da von $p_H = 6$ an das Eisen der gewöhnlichen Eisensalze ziemlich quantitativ ausfällt und wegen der nötigen Trockengewichtsbestimmungen auf eine möglichst niederschlagsfreie Nährlösung Wert gelegt werden mußte. Als brauchbar erwies sich $4 \cdot 10^{-5}$ mol Eisenglyzerinphosphat (reinstes Präparat von Merck mit 14,3% Fe). Damit wurden in Neutralglaskolben bei den p_H-Werten 5,8—6,3 und 7,0—7,6 sehr gute Kulturen erhalten, die durchweg dunkler grün waren als entsprechende Kulturen mit Ferrosulfat als Eisenquelle.

Von den Spurenelementen wurde der Stammnährlösung von vornherein Mangan zugegeben, da nach den Untersuchungen von Hopkins (1934) und Pirson (1937) *Chlorella* nur bei Gegenwart von Mangan gut wächst.

Die 300 ccm fassenden Quarz-Erlenmeyer-Kolben, mit der für jeden Versuch stets frisch hergestellten Nährlösung beschickt (je Kolben 150 ccm), wurden 1 Stunde in strömendem Dampf

bei 100° C sterilisiert. Nach Erkalten wurden sie mit einer ganz verdünnten Zellsuspension in destilliertem Wasser aus einer Agarkultur in Quarz-Reagensgläsern beimpft. Jeder Kolben erhielt ungefähr 20 000—30 000 Zellen, also pro Kubikzentimeter ca. 150 Zellen. Bei allen Versuchen war diese Impfmenge gleich groß; sie ist sehr gering im Verhältnis zu den erhaltenen Endwerten. Weiter konnte die eingeimpfte Zellzahl nicht vermindert werden, da unter den gegebenen Verhältnissen eine Kulturperiode in anorganischer Nährlösung an der Kulturanlage etwa 20 Tage dauerte. Bei Verwendung dieser Impfmenge war 5 Tage nach dem Impfen der erste grüne Anflug in den Normalkulturen zu sehen (»Tag des Anwachsens«). Die Zellzahl betrug zu diesem Zeitpunkt 1—2 Millionen pro Kubikzentimeter Algensuspension.

3. Auswertung.

Die Auswertung der Kulturen geschah durch Zellzählung mittels der Zählkammer, Umrechnung der gefundenen Zahlen auf 1 ccm Algensuspension (ausgeführt zu bestimmten Zeiten während der Kulturperiode unter steriler Probeentnahme) und durch Bezeichnung in den Tabellen und Abbildungen mit $ZZ \cdot 10^6 =$ Zellzahl in Millionen. Die Ermittlung der Endwerte erfolgte durch Volumenbestimmung mit dem Hämatokriten und Trockengewichtsbestimmung mit Hilfe der Jenaer Glasfiltertiegel 10 G 4 mit Asbestauflage (Trocknen 15 Std. bei 70° C im elektr. Ofen). Außerdem wurden Chlorophyllbestimmungen [vgl. Pirson (1937)] ausgeführt. Hierzu wurde stets so viel Algensuspension verwendet, daß die bestimmte Menge mindestens ungefähr 50 γ/25 ccm betrug. Bei den »Mangelkulturen in Quarz« (s. u.), die kaum noch Chlorophyll enthielten, gelangten daher mindestens 50 ccm Suspension zur Auswertung. Die p_H-Messung geschah mit dem Trenel-Acidimeter.

A. Vorversuche.

1. Der Einfluß des Glases.

Zunächst wurde untersucht, ob in Kolben aus Neutralglas sich ein Einfluß bestimmter Spurenelemente feststellen läßt, wenn die Stammnährlösung mit den hochgereinigten und den gewöhnlichen, analysenreinen Chemikalien angesetzt war. Hier-

bei ergaben sich keine Unterschiede im Wachstum. Ebenso hatte der Zusatz von Hoagland-Lösung keinen Einfluß; auch ohne diese wurden in allen Fällen dunkelgrüne Massenkulturen in normaler Zeit erzielt. Eine Wiedergabe der Versuchsdaten erübrigt sich.

Die Verwendung von Glas ist also durchaus zu verwerfen. Auf die Notwendigkeit der Verwendung von Quarz hat zuerst Benecke (1907 I), später Bokorny (1912) hingewiesen. Auch Roberg (1932) kultivierte seine Chlorellen teilweise in Quarz, ohne allerdings große Unterschiede im Vergleich zu Jenaer Glas feststellen zu können. Dies war auch bei Young (1935) und anderen der Fall. Jedoch liegt dies daran, daß diese Autoren keinen Wert auf die Erzielung von Massenkulturen legten. Denn die Spurenelemente können ein einigermaßen leidliches Wachstum noch in Konzentrationen ermöglichen, die als Verunreinigung unvermeidbar sind und durch die Kultur selbst in den ersten Entwicklungsstadien zunächst aufgezehrt werden müssen, wenn Unterschiede erhalten werden sollen.

2. Erzielung optimaler Algenkulturen (Massenkulturen).

In gewöhnlichem, in seiner Lichtstärke schwankendem Tageslicht erhält man bei autotropher Ernährung keine dunkelgrünen Massenkulturen. Daher sind in den bisher ausgeführten Arbeiten, in denen dieser Punkt nicht beachtet wurde, keine Massenkulturen erzielt worden; auch Wachstumssteigerungen konnten durch Zugabe von bestimmten Substanzen nur in beschränktem Maß oder überhaupt nicht erreicht werden. Eine unbedingte Voraussetzung war es infolgedessen, die Kultur bei anorganischer Ernährung bei starkem kontinuierlichen Licht und bei ständiger Durchlüftung (Luft + 5% CO_2) auszuführen. Parallelversuche in Neutralglas mit der Stammnährlösung am Nordlichtfenster des Kulturraumes und an der Kulturanlage bestätigten dies; Kulturen am Fenster machten schon fast den Eindruck einer Mangelkultur (Tab. 1).

Das Wachstum geht bei dem schwachen Licht viel langsamer vor sich und hört nach ungefähr 7 Wochen auf, während an der Kulturanlage das Wachstum weit stärker ist und schon nach

Tabelle 1.

	Versuch am Nordlichtfenster (Durchschnitt aus 3 Kolben, Neutralglas)	Versuch an der Kulturanlage (Durchschnitt aus 3 Kolben, Neutralglas)
ZZ · 10^6 in 1 ccm	70	280
Vol. in 1 ccm	2,6 cmm	7,1 cmm
Chlorophyll in 1 ccm . . .	8 γ	28 γ
Chlorophyll/Zellvolumen .	3,08 γ	3,95 γ
p_H Anfang	5,8	5,8
p_H Ende	6,2	6,45
Kulturdauer in Tagen . .	50	20

20 Tagen erlischt. Rein äußerlich unterscheiden sich beide Kulturen in der Weise, daß die erste hellgrün, die zweite dunkelgrün aussieht.

B. Hauptversuche.

1. Mangelkulturen in Quarz.

Die Tab. 2 zeigt die Größe der erzielbaren Ausschläge. Der Versuch in Neutralglas wurde mit der Stammlösung aus nicht besonders gereinigten Chemikalien angesetzt, während im Versuch mit Quarz die hochgereinigten Chemikalien benutzt wurden. Die Ergebnisse der Tab. 2 waren jederzeit unabhängig von der Jahreszeit reproduzierbar.

Tabelle 2.

	1. Versuch in Neutralglas	2. Versuch in Quarz
ZZ · 10^6 in 1 ccm	250	6,8
Vol. in 1 ccm	6,9 cmm	0,4 cmm
Trockengewicht in 1 ccm .	1790 γ	101 γ
Chlorophyll in 1 ccm . . .	27 γ	0,9 γ
Chlorophyll/γ Trockengew. .	0,015 γ	0,0089 γ
p_H Anfang	5,8	5,8
p_H Ende	6,4	5,9
Kulturdauer in Tagen . .	20	12
Temperatur	18—20°	18—20°

Die Kultur in Quarz stellte 9 Tage nach dem Impfen ihr Wachstum ein, wie die Zellzählung ergab. Die Zellen waren sehr verschieden groß und zeigten Klumpenbildung. Die Kultur

sah blaßgrün bis gelb aus. Es war also eine offensichtliche Schädigung zu verzeichnen. Die Kultur in Neutralglas wuchs im ganzen 20 Tage; dann war der Höhepunkt überschritten. Sie sah dunkel- bis schwarzgrün aus und stand in stärkstem Gegensatz zu der Mangelkultur in Quarz, wie diese von jetzt an genannt werden soll.

2. Wirkung der Hoagland-Zusatzlösung.

Wir stellten uns die Hoagland-A-Lösung [Hoagland und Snyder (1933)] aus den reinsten Chemikalien mit Quarzwasser her und setzten folgenden Versuch an:

1. Zwei Kolben Stammnährlösung in Neutralglas (Kontrolle).
2. Zwei Kolben Stammnährlösung in Quarz.
3. Zwei Kolben Stammnährlösung + Hoagland-A in Quarz.

Tab. 3 gibt die Endwerte des Versuchs wieder, der mehrere Male mit gleichen oder nur wenig abweichenden Resultaten wiederholt wurde. Die zugesetzte Menge der Hoagland-A-Lösung betrug nach Vorschrift 1 ccm auf 1 l Stammnährlösung.

Tabelle 3.

	Stammnährlösung		
	1 in Neutralglas	2 in Quarz	3 + Hoagland-A in Quarz
ZZ · 10^6 in 1 ccm	240	6,5	260
Vol. in 1 ccm	7,1 cmm	0,38 cmm	7,2 cmm
Trockengewicht in 1 ccm .	1840 γ	105 γ	1850 γ
Chlorophyll in 1 ccm . . .	28 γ	0,95 γ	32 γ
Chlorophyll/γ Trockengew. .	0,0152 γ	0,009 γ	0,0173 γ
p_H Anfang	5,8	5,8	5,8
p_H Ende	6,4	5,9	6,5
Kulturdauer in Tagen . .	23	9	23
Temperatur	18—20°	18—20°	18—20°

Diese hat vollkommen genügt, um dasselbe Wachstum zu erzeugen wie das Neutralglas. Die Mangelkultur in Quarz mußte wieder vorzeitig, d. h. nach 9 Tagen, abgebrochen werden, da ein Wachstum nicht mehr stattfand. Bei längerer Kulturdauer verblaßte sie immer mehr, d. h. die anfänglich gebildete Chloro-

phyllmenge wird langsam abgebaut. Die im vorigen Abschnitt erwähnte Verklumpung war oft nicht nur mikroskopisch, sondern auch makroskopisch in den Mangelkulturen in Quarz deutlich zu sehen.

In Tab. 4 folgt ein Versuch in Quarz mit verschiedenen Hoagland-A-Lösungsmengen in der Stammnährlösung (0,1 bis 50 ccm pro Liter).

Diese Versuchsserie wurde mehrfach wiederholt, auch bei geändertem Anfangs-p_H-Wert (6,5); dessen Ansteigen während der Kulturperiode ganz gering war. Die Ergebnisse waren im Gegensatz hierzu immer dieselben.

Aus den Versuchen geht also hervor, daß schon $^1/_{10}$ der normalen Hoagland-Menge erhebliche Wachstumssteigerung bei *Chlorella* hervorruft. Steigerungen über die normale Menge hinaus haben nur wenig Einfluß. Schon bei Anwendung der 10fachen Menge tritt eine deutliche Wachstumshemmung auf; denn nach ungefähr 13 Tagen ist Wachstumsstillstand zu verzeichnen. Derartige Kulturen (Nr. 7 der Tab. 4) ähneln sehr denen von Nr. 2. Bei Anwendung noch höherer Konzentrationen (50fache Menge) wirkt die Hoagland-Lösung so giftig, daß auch nach sehr langer Zeit überhaupt kein Wachstum eintritt (s. Tab. 4), wahrscheinlich infolge der sehr hohen Kupferkonzentration (Abb. 1). Ihr Wirkungsbereich ist also sehr eng begrenzt.

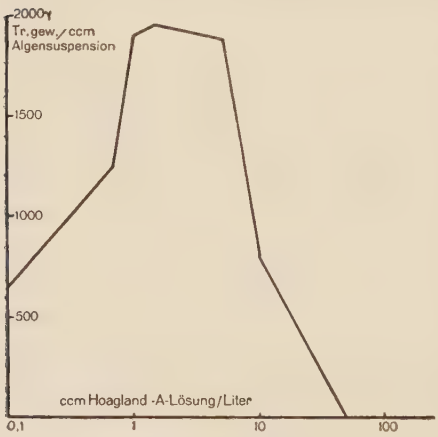

Abb. 1. Abhängigkeit des End-Trockengewichts von der zugesetzten Menge Hoaglandlösung.

3. Versuche mit Bor.

Da das Neutralglas von den als wichtig angesehenen Spurenelementen in der Hauptsache Bor als B_2O_3 [11 %, s. Pirson (1937)] enthält, und auch in der Hoagland-A-Lösung von allen Ele-

Tabelle 4.

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Kontrolle	+ 0,1 ccm	+ 0,6 ccm	+ 1 ccm	+ 1,5 ccm	+ 5 ccm	+ 10 ccm	+ 50 ccm
	Hoagland-A-Lösung							
ZZ · 10^6 in 1 ccm	7	75	150	260	300	290	110	—
Vol. in 1 ccm	0,4 cmm	3,5 cmm	5,6 cmm	7,0 cmm	7,6 mcm	7,3 cmm	4,0 cmm	—
Trockengewicht in 1 ccm	108 γ	650 γ	1280 γ	1890 γ	1050 γ	1880 γ	810 γ	—
Chlorophyll in 1 ccm	0,8 γ	9 γ	22 γ	26 γ	31 γ	29 γ	12 γ	—
Chlorophyll/γ Trockengewicht	0,0074 γ	0,0138 γ	0,0171 γ	0,0138 γ	0,0159 γ	0,0154 γ	0,0148 γ	—
pH Anfang	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8
pH Ende	5,9	6,2	6,3	6,45	6,6	6,55	6,3	5,8
Kulturdauer in Tagen	9	13	20	24	24	24	13	30
Temperatur = 20—21°								

menten das Bor am stärksten vertreten ist, so vermuteten wir, daß Bor das wirksamste Element sei. Mit einer borfreien Hoagland-Lösung wurden folgende Versuche in Quarz angesetzt:

1. Stammnährlösung (Kontrolle).
2. Stammnährlösung + 60 γ B pro Liter.
3. Stammnährlösung + 600 γ B pro Liter.
4. Stammnährlösung + 3 mg B pro Liter.
5. Stammnährlösung + 1 ccm Hoagland-A ohne B pro Liter.
6. Stammnährlösung + 1 ccm Hoagland-A pro Liter.

Nr. 2 enthält $^1/_{10}$ der in der Hoagland-Lösung enthaltenen Bormenge, Nr. 3 die normale und Nr. 4 die fünffache. Tab. 5 zeigt die Ergebnisse.

Die vermutete Borbedürftigkeit blieb also aus; denn Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Borkulturen einerseits, sowie zwischen der Hoagland-A-Lösung und der Hoagland-Lösung ohne Bor andererseits waren nicht vorhanden. Auch beim Anlegen einer Kultur aus einer Mangelkultur in Quarz ließ sich kein Boreffekt aufdecken. Sehr lange Kulturdauer (über 3 Wochen) änderte an diesen Ergebnissen nichts, so daß damit dem Einwand, die Kulturen wären zu früh abgebrochen, begegnet ist.

Tabelle 5.

	1 Kontrolle	2 60 γ Bor	3 600 γ Bor	4 3 mg Bor	5 Hoagland-A-Lösung ohne Bor	6 Hoagland-A-Lösung
ZZ · 10^6 in 1 ccm	6,4	6,5	6,8	6,3	320	310
Vol. in 1 ccm	0,38cmm	0,38cmm	0,4 cmm	0,39cmm	7,1 cmm	7,1 cmm
Trockengewicht in 1 ccm	105 γ	102 γ	106 γ	106 γ	1850 γ	1820 γ
Chlorophyll in 1 ccm	1,1 γ	1,1 γ	1,1 γ	1,0 γ	31 γ	30 γ
Chlorophyll/γ Trockengew.	0,0105 γ	0,0108 γ	0,0104 γ	0,0095 γ	0,0168 γ	0,0165 γ
pH Anfang	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8
pH Ende	5,9	6,0	6,0	6,0	6,5	6,5
Kulturdauer in Tagen	9	10	10	10	23	23
Temperatur = 18,5—21°						

Die für die höheren Pflanzen nachgewiesene Borbedürftigkeit [Brenchley & Warington (1927), Scharrer & Schropp (1933 u. 1936), Schmucker (1935), Rehm (1937), Maier (1938)] besteht also bei *Chlorella* im Rahmen der hier angewandten Methodik nicht.

4. Verhalten der Mangelkultur in Quarz nach Überführen in Neutralglas.

Eine Mangelkultur in Quarz wurde nach Einstellung ihres an sich sehr kümmerlichen Wachstums am 9. Tage steril im Impfkasten in Neutralglas übergeführt. Etwa nach 20 Stunden begann die Kultur deutlich zu ergrünen, wuchs dann langsam weiter und erreichte maximale Dichte innerhalb von 2 weiteren Wochen. Der Mangel in Quarz kann sogar ziemlich lange ertragen werden; es wurden Versuche gemacht, bei denen noch 20 Tage nach dem Impfen in Quarzkolben die Überführung in Neutralglas stattfand und die Kultur gleich darauf unter Verschwinden der Verklumpung mit Ergrünen und Weiterwachsen reagierte (Abb. 2). Die Kulturen wiesen nicht nur in der Zellzahl, sondern auch in ihren anderen auswertbaren Eigenschaften die Endwerte einer Normalkultur auf. Die Kontrollen in Quarz dagegen verblaßten immer mehr und die Zellen waren sehr stark verklumpt; eine weitere Zell- und Substanzvermehrung fand in

keinem Falle statt. Ganz ähnliche Ergebnisse wie mit Neutralglas konnten wir auch mit Jenaer Geräteglas 20 erzielen.

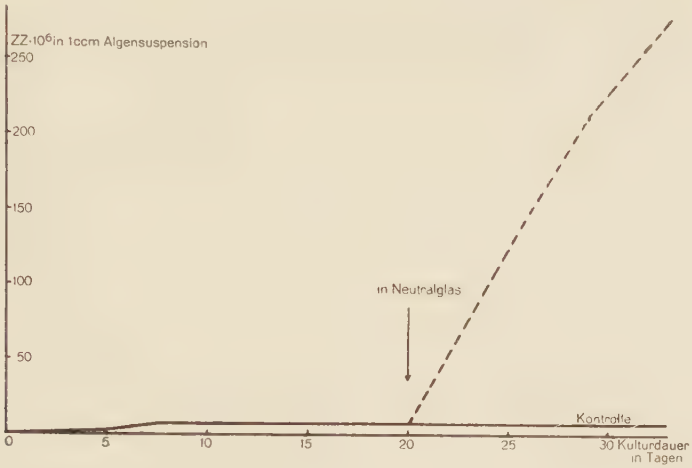

Abb. 2. Mangelkultur in Quarz nach 20 Tagen in Neutralglas übergeführt.

5. Versuche mit Zink.

a) Bei autotropher Ernährung.

Da eine Beeinflussung des Wachstumsvorgangs durch Bor nach Abschnitt 3 nicht stattfindet, mußte an eine Zinkwirkung gedacht werden; denn das Neutralglas besitzt einen ZnO-Gehalt von 1,5%. Auch in der HOAGLAND-A-Lösung ist Zink enthalten (55 γ $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$ pro 1 ccm), wenn auch nicht in größerer Menge wie etwa Bor und Mangan.

Wir setzten nun einen Versuch mit der Stammnährlösung in 6 Quarzkolben an; daraus wurden also »Mangelkulturen in Quarz«. 10 Tage nach dem Impfen waren alle Kolben hellgrün bis gelb. Dann wurde der Inhalt zweier Quarzkolben steril in zwei Neutralglaskolben (Nr. 3 und 4) übergeführt und zwei Kulturen in ihren Quarzgefäßen steril mit je 15 γ $ZnSO_4$-Lösung (Nr. 5 und 6) versetzt. Die beiden Kolben Nr. 1 und 2 blieben unverändert als Kontrolle (Abb. 3). In der Tat fand jetzt ein Gleichlaufen im Wachstum statt zwischen der ehemaligen Quarz-Mangelkultur in Neutralglas und der mit nachträglicher Zinkzugabe versetzten Kultur bis ungefähr zum 7. Tage. Dann stellten die bei-

den Kolben Nr. 5 und 6 ihr Wachstum ein, während die in Neutralglas übergeführten »Mangelkulturen in Quarz« noch wei-

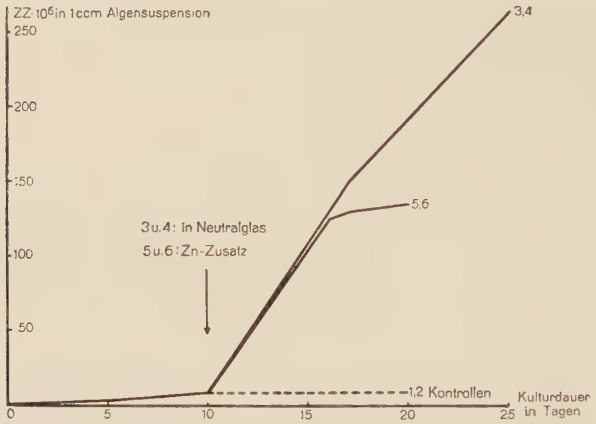

Abb. 3. Mangelkulturen in Quarz; nach 10 Tagen Nr. 3 und 4 in Neutralglas übergeführt, Nr. 5 und 6 mit 15 γ Zinksulfat versetzt. Nr. 1 und 2 Kontrollen.

ter wuchsen (vgl. auch Abschnitt 4). Es lag also ein Zinkeinfluß vor, doch genügte die angewandte Zinkmenge, die schon etwas größer war als die in der HOAGLAND-Lösung vorhandene, nicht, um ein optimales Wachstum (dunkelgrüne Massenkultur) zu erzeugen.

Die Bestätigung, daß der Zn-Gehalt der HOAGLAND-A-Lösung der entscheidende Faktor ist, ging aus Versuchen hervor, die mit einer HOAGLAND-Lösung ohne Bor und Zink (genau so wie oben hergestellt) angesetzt waren (Tab. 6).

1. Stammnährlösung + 1 ccm HOAGLAND-A-Lösung pro Liter.
2. Stammnährlösung + 1 ccm HOAGLAND-A-Lösung ohne Bor und ohne Zink pro Liter.
3. Stammnährlösung + 200 γ Zn pro Liter.

Dieser Versuch (Abb. 4) zeigt ganz eindeutig, daß die Mangelerscheinungen durch Zink vollkommen behoben werden können. Steigerung der Zusatzlösung ohne Bor und ohne Zink führt zu keiner Kompensation, sondern sehr bald bei Verwendung 5facher Menge zu einer vollkommenen

Tabelle 6.

	1 + Hoagland-A-Lösung	2 + Hoagland-A-Lös. ohne Bor und ohne Zink	3 + Zink
ZZ · 10^6 in 1 ccm	300	80	310
Vol. in 1 ccm	7,2 cmm	2,7 cmm	7,1 cmm
Trockengewicht in 1 ccm .	1800 γ	690 γ	1810 γ
Chlorophyll in 1 ccm . . .	30 γ	10 γ	32 γ
Chlorophyll γ Trockengew. .	0,0167 γ	0,0145 γ	0,0177 γ
p_H Anfang	5,8	5,8	5,8
p_H Ende	6,5	6,3	6,55
Kulturdauer in Tagen . .	22	15	22
Temperatur = 22—24°			

Wachstumshemmung. Dabei erweist sich die Hoagland-Lösung ohne Bor und ohne Zink viel schädlicher als die vollkommene Hoagland-Lösung (s. Abb. 1). Wiedereinführen von Bor hatte keinen Einfluß. Der entstandene Mangel bei Verwendung der Hoagland-Lösung ohne Bor und ohne Zink ist also tatsächlich nur dem Zink allein zuzuschreiben. Die Tatsache, daß bei Abwesenheit der Hoagland-Lösung mehr Zink geboten werden muß, als diese zur Verfügung stellt, läßt den Schluß zu, daß die Zinkwirkung der Hoagland-Lösung durch andere darin vorhandene Elemente gefördert wird, ohne daß diese bei Abwesenheit von Zink in Wirkung treten.

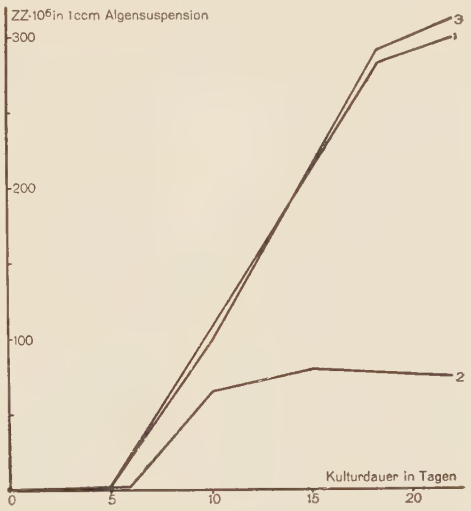

Abb. 4. Nr. 1 Stammnährlösung + vollständige Hoagland-A-Lösung; Nr. 2 Stammnährlösung + Hoagland-A-Lösung, jedoch ohne Bor und ohne Zink; Nr. 3 Stammnährlösung + 30 γ Zink zu 150 ccm Nährlösung.

Weiterhin wurden die Mangelerscheinungen bei verschiedenen p_H-Werten untersucht (Abb. 5).

Diese Versuche ergaben also, daß der Mangel im ganzen

Wachstumsbereich von *Chlorella* p_H-unabhängig ist. Bei längerer Versuchszeit wurde das anfangs noch sehr spärlich gebildete Chlorophyll abgebaut. Alle derartigen Kulturen reagierten aber sofort mit Weiterwachsen, wenn sie mit Zink versetzt oder steril in Neutralglas übergeführt wurden.

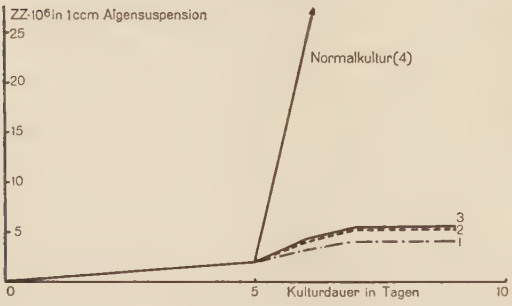

Abb. 5. Mangelkulturen in Quarz bei verschiedenen p_H-Werten. Nr. 1 $p_H = 4{,}5$; Nr. 2 $p_H = 5{,}8$; Nr. 3 $p_H = 7{,}0$; Nr. 4 Vollnährlösung.

Die weiteren Versuche sollten den Wirkungsbereich des Zinks abgrenzen. Höhere Pflanzen benötigen etwa 500 γ Zn pro Liter [Sommer & Lipmann (1926)]. Nach Scharrer & Schropp (1934) wirken bei Roggen sogar ca. 30 mg Zn/l fördernd. Für *Aspergillus* ist nach den verschiedenen Forschern [Bortels (1927), Gollmick (1936) u. a.] ungefähr 1 mg pro Liter unbedingt nötig. Bei *Chlorella* und anderen Algen erzielte Roberg (1932) mit 100 γ Zn pro Liter eine Wachstumsförderung.

Um den gesamten Wirkungsbereich des Zinks zu erfassen, der sich nach Vorversuchen als sehr groß erwies, waren wir gezwungen, weniger Phosphat zu nehmen, damit das Zink nicht als Phosphat ausgefällt wird, wenn es in größerer Menge geboten wird. $^1/_{10}$ der üblichen Phosphatmenge ließ auch bei Anwendung von 100 mg $ZnSO_4$ pro 150 ccm kaum einen Niederschlag entstehen. Allerdings war nun das Pufferungsvermögen nicht sehr stark:

		Zink pro Liter (als Zinksulfat)
1.	Stammnährlösung ohne Zink	
2.	,,	3,5 γ
3.	,,	17,5 γ
4.	,,	35 γ
5.	,,	87,5 γ
6.	,,	175 γ
7.	,,	875 γ
8.	,,	1,750 mg
9.	,,	17,5 mg
10.	,,	175 mg

Abb. 6 veranschaulicht das Wachstum von Nr. 1—6 und Tab. 7 gibt die Zusammenstellung der Endwerte für Nr. 1—10.

Die Kultur Nr. 1 war hellgrün bis gelb wie üblich; Nr. 2 war hellgrün, also auch noch eine ausgesprochene Mangelkultur; von Nr. 3 an trat eine langsam stärker werdende Ergrünung der Kulturen ein, die bis Nr. 6 anhielt. Die mitgeteilten Ergebnisse beziehen sich auf einen Versuch, der am Ende dieser Untersuchung gemacht wurde, während am Anfang der Arbeit schon bei etwa 30—50 γ $ZnSO_4$/150 ccm optimale Kulturen erzielt wurden. Dies ist darauf zurückzuführen, daß sich im Laufe der Zeit die Arbeit immer sauberer gestalten ließ, so daß eine etwas größere Zinkmenge zur Erzielung der dunkelgrünen Massenkultur nötig wurde. Die Versuchsansätze Nr. 6 bis 9 sind ziemlich gleich, in höheren Gaben (Nr. 10) wirkt Zink giftig (Versuchsdauer über 30 Tage).

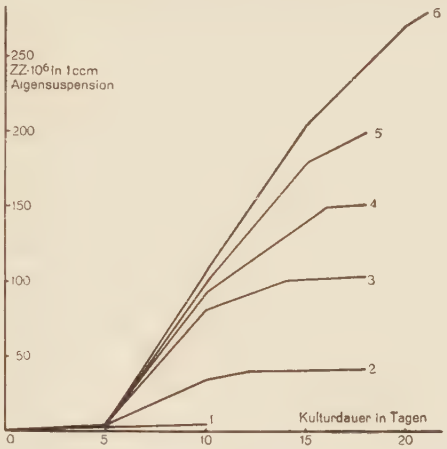

Abb. 6. Abhängigkeit des Wachstums von der Zinkmenge. Nr. 1 Stammnährlösung ohne Zink; Nr. 2 mit 3,5 γ Zink; Nr. 3 mit 17,5 γ Zink, Nr. 4 mit 35 γ Zink; Nr. 5 mit 87,5 γ Zink; Nr. 6 mit 175 γ Zink jeweils pro Liter Nährlösung.

Die Zinkwirkung ist auch unabhängig vom p_H-Wert der Nährlösung [vgl. aber Tamiya (1928)], jedenfalls bei Konzentrationen bis zu 1 mg $ZnSO_4$/150 ccm. Größere Zinkmengen konnten bei diesen Versuchen wegen der zum Teil starken Niederschlagsbildung nicht angewandt werden. Diese Versuche brauchen nicht wiedergegeben zu werden. Die optimale Wirkung ist stets bei 200 γ Zn pro Liter ($= 2 \cdot 10^{-5}$ % Zn $= 3 \cdot 10^{-6}$ mol Zn) zu sehen, ebenso wie sich die Zinkwirkung schon bei einer Verdünnung von 1 : 1 Milliarde (Tab. 7, Nr. 2) deutlich zeigt.

In Abb. 7 ist der gesamte Wirkungsbereich des Zinks dargestellt; die erreichten Endwerte des Trockengewichts sind in Abhängigkeit von der jeweiligen Konzentration eingetragen. Die

Tabelle 7.

	1 Kontrolle	2 3,5 γ Zn	3 17,5 γ Zn	4 35 γ Zn	5 87,5 γ Zn	6 175 γ Zn	7 875 γ Zn	8 1,750 mg Zn	9 17,5 mg Zn	10 175 mg Zn
ZZ · 10^6 in 1 ccm	5,8	40	100	150	195	280	300	290	290	–
Vol. in 1 ccm . .	0,4 cmm	2,0 cmm	3,8 cmm	5,1 cmm	6,2 cmm	7,0 cmm	7,3 cmm	7,2 cmm	7,1 cmm	—
Trockengewicht in 1 ccm	120 γ	375 γ	900 γ	1210 γ	1500 γ	1840 γ	1850 γ	1890 γ	1860 γ	.
Chlorophyll in 1 ccm	0,8 γ	3,0 γ	14 γ	20 γ	24 γ	30 γ	31 γ	32 γ	30 γ	—
Chlorophyll/ γ Trockengew. .	0,0067 γ	0,0080 γ	0,0150 γ	0,0165 γ	0,0160 γ	0,0163 γ	0,0167 γ	0,0169 γ	0,0161 γ	–
pH Anfang . . .	5,2	5,1	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
pH Ende	5,7	5,9	6,1	6,25	6,4	6,6	6,7	6,7	6,7	5,0
Kulturdauer in Tagen	10	12	14	16	18	21	21	21	21	32
Temperatur 19,5—21°										

Kurve ist nicht die übliche spitze Maximumkurve, sondern eine breite Sattelkurve, da *Chlorella* eine große Toleranz gegenüber höheren Zinkgaben zeigt.

Es wurde nun geprüft, ob durch Überimpfen aus einer Mangelkultur in Quarz in einer neuen Versuchsreihe der Mangeleffekt auch wieder allein durch Zinkzusatz behoben werden könnte. Dabei ließ sich folgendes fesstellen (Tab. 8): Der Mangeleffekt wurde noch stärker ausgeprägt. Diese Kulturen wurden jetzt überhaupt nicht mehr blaßgrün, sondern sahen nur hellgelb aus; der Chlorophyllgehalt pro Trockengewicht von Nr. 2 betrug nur noch 12,5 % von dem in Nr. 3 (s. Tab. 8). Durch Anwendung der entsprechenden Zinkmenge konnte wieder ein optimales Wachstum erzielt werden. Bei Überführen von solchen Quarz-Mangelkulturen in Neutralglas wurden diese ebenso dunkelgrün wie die mit Zinkzusatz versehenen Kulturen in Quarzgefäßen. Die vom Glas in Lösung gehende Zn-Menge ist also noch groß genug, um den Mangel vollkommen zu beheben:

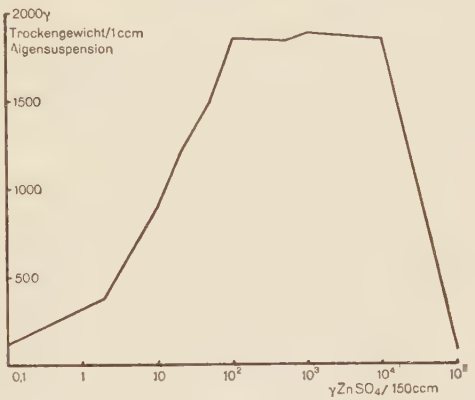

Abb. 7. Abhängigkeit des End-Trockengewichts von der Zinkmenge.

1. Stammnährlösung (neubeimpft von Agarkultur, Kontrolle).
2. ,, aus Quarz-Mangelkultur übergeimpft.
3. ,, + 30 γ Zn/150 ccm als $ZnSO_4$ aus Quarz-Mangelkultur übergeimpft.
4. Aus Nr. 2 übergeführt in Neutralglas.

Nr. 1—3 waren zur gleichen Zeit angesetzt, Nr. 4 liegt natürlich zeitlich später.

Der auf Lepierre (1913) zurückgehende Befund von der Ersetzbarkeit des Zinks durch das verwandte Cadmium wurde ebenfalls in einigen Versuchen geprüft. Die Versuche fielen alle

Tabelle 8.

	1	2	3	4
	neu beimpft	Stammnährlösung aus Quarzmangelkultur beimpft	+ opt. Zn-Menge	Nr. 2 übergeführt in Neutralglas
ZZ · 10^6 in 1 ccm . . .	7	2	290	240
Vol. in 1 ccm	0,45 cmm	0,22 cmm	7,9 cmm	7,8 cmm
Trockengewicht in 1 ccm	110 γ	45 γ	1820 γ	1730 γ
Chlorophyll in 1 ccm .	1,1 γ	0,1 γ	32 γ	26 γ
Chloroph./γ Trockengew.	0,010 γ	0,0022 γ	0,0176 γ	0,0156 γ
p_H Anfang	5,9	5,9	5,9	6,0
p_H Ende	6,0	6,0	6,55	6,65
Kulturdauer in Tagen .	9	9	21	16
Temperatur = 17,5—20°.				

negativ aus, teilweise fand sogar vollkommene Wachstumshemmung statt. Die Zusätze zur Stammnährlösung betrugen 1 γ, 10 γ, 100 γ Cd pro Liter. Zink läßt sich also bei *Chlorella* durch Cadmium nicht ersetzen, wie schon für *Aspergillus* von Gollmick (1936) gezeigt werden konnte.

Die Wirkung des Zinks äußert sich in einer besonderen Erscheinung. Schon ungefähr 12 Stunden nach Zinkzusatz zu einer Quarz-Mangelkultur wird ein leichtes Ergrünen der Kultur sichtbar. Wir untersuchten daraufhin die Chlorophyllzunahme in Abhängigkeit von der Substanzproduktion.

In einer 8 Tage alten, stark chlorotischen Mangelkultur wurde die Zellzahl sowie der Chlorophyllgehalt bestimmt; dann gaben wir 50 γ $ZnSO_4$ in Lösung steril zu im Impfkasten. Nach 24 Std. wurden wieder Zellzahl, Trockengewicht und der Chlorophyllgehalt gemessen. Dabei ergab sich (Tab. 9 und Abb. 8), daß der erste greifbare Vorgang eindeutig die Chlorophyllzunahme ist. Der Chlorophyllgehalt steigt innerhalb der ersten 24 Std. nach Zinkzugabe auf das Doppelte an, so daß die Chlorose verschwindet; während dieser Zeit sistiert die Zellvermehrung noch. Diese stellt die zweite Phase in der Behebung der Zinkmangelsymptome dar; dabei erfährt der Chlorophyllgehalt der einzelnen Zelle eine kleine Abnahme.

Zu Beginn des Versuches sind die Zellen in der »Mangelkultur in Quarz« verschieden groß; vielfach sind sie verklumpt und der Chloroplast ist deutlich geschrumpft. 24 Std. nach Zinkzugabe

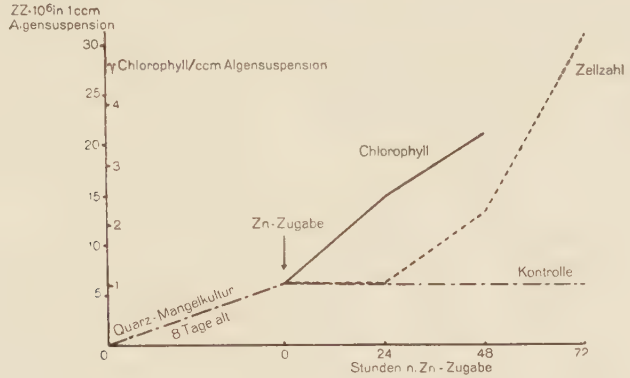

Abb. 8. Einfluß des Zinks auf Chlorophyll- und Zellproduktion bei Zinkzugabe zu 8 Tage alten Mangelkulturen.

ist die Ergrünung deutlich zu sehen; die Schrumpfung der Chloroplasten ist zurückgegangen, jedoch die Verklumpung der Zellen erhalten geblieben. Nach abermals 24 Std. ist auch die Verklumpung ganz zurückgegangen und die Zellvermehrung hat wieder eingesetzt.

Tabelle 9.

8 Tage alte „Mangelkulturen in Quarz".

	Kontrolle Versuchs-		Versuchs-Beginn	24 Std. nach Zn-Zusatz	48 Std. nach Zn-Zusatz
	Beginn	Ende			
ZZ · 10^6 in 1 ccm . . .	6,4	6,4	6,2	6,4	13
Trockengewicht in 1 ccm	118 γ	120 γ	115 γ	118 γ	200 γ
Chlorophyll in 1 ccm .	1,0 γ	1,0 γ	1,0 γ	2,4 γ	3,5 γ
p_H-Wert	5,8	5,85	5,8	5,8	5,85
Chloroph./γ Trockengew.	0,0085 γ	0,0084 γ	0,0087 γ	0,0202 γ	0,0175 γ

Es sei hier nochmals betont, daß die Messung der Chlorophyllmenge mit hinreichender Menge Algensuspension (50 ccm) ausgeführt wurde, so daß die angegebenen Unterschiede zwischen 1 γ und 2,4 γ unbedingt genau sind.

Es wäre noch festzustellen gewesen, ob schon vor der Chloro-

phyllzunahme eine Assimilationssteigerung auftritt, wie etwa bei Kaliumzugabe zu K-Mangelkulturen [Pirson (1937)], die einen Anstieg der Photosynthese ohne gleichzeitige Chlorophyllvermehrung zur Folge hat. Jedoch standen die hierzu nötigen Manometergefäße aus Quarz nicht zur Verfügung.

Unsere Feststellung zeigt also einen unmittelbaren Einfluß des Zinks auf die Chlorophyll- bzw. Chloroplastenbildung. Daß das Zink in irgendeinem Zusammenhang mit der Chlorophyllbildung steht, zeigten auch Bertrand und Andreitschewa (1933), nach denen zwischen grüner Farbe der Blätter und deren Zinkgehalt eine enge Beziehung vorhanden ist. Barnette und Warner (1935) konnten eine Chlorose der Maispflanze durch Zusatz von Zinklösungen zu ihren Kulturen beheben. Gracanin (1928) dagegen beobachtete geradezu eine Schädigung der chlorophyllführenden Zellen durch Zink. Es handelt sich bei ihm jedoch um eine zusätzliche Zinkgabe, denn seine Versuchspflanzen waren gesund und normal, so daß offenbar eine Schädigung durch die verwendeten, immerhin sehr hohen Zinkmengen vorlag.

6. Versuche mit Kupfer.

Roberg (1932) hat eine leichte Förderung des *Chlorella*-Wachstums durch Zusatz von 1 γ Cu auf 100 ccm Nährlösung festgestellt, während Hopkins bei Zusatz einer ca. 5fach größeren Menge lediglich Schädigung fand. Auch nach unseren, mit einer zinkfreien Hoagland-A-Lösung angestellten Versuchen spielt Kupfer mengenmäßig mindestens eine sehr untergeordnete Rolle bei *Chlorella*.

Kupferzusatz allein ohne Zink hatte nun ebenfalls keine Wirkung; die angewandten Mengen betrugen 0,5, 5 und 50 γ $CuSO_4$ auf 150 ccm Nährlösung. Die Kulturen blieben unsere bekannten »Mangelkulturen in Quarz«. Bei Zusatz von 50 γ $CuSO_4$/150 ccm Stammnährlösung fand sogar vollkommene Wachstumshemmung statt; auch bei sehr langer Versuchszeit (über 30 Tage) war nicht das geringste Wachstum zu sehen; die Zellen waren sogar fast völlig abgestorben, wie die mikroskopische Untersuchung ergab.

Wenn überhaupt Kupfer für *Chlorella* nötig ist, so liegt die optimale Menge unter der mit der hier angewandten Methode

erreichbaren Grenze. Hierbei wäre gemäß neuen Befunden von Emerson und Lewis (1939) an Verunreinigung des hier angewandten Eisenglyzerinphosphats zu denken, das, wie eingangs erwähnt, keiner besonderen Reinigung unterzogen worden war. Auch ist an den Befund von Green, McCarthy und King (1939) zu erinnern, wonach die Atmung und Photosynthese von *Chlorella* sehr empfindich gegen Stoffe ist, die eine Kupferkatalyse hemmen.

7. Versuche mit Calcium.

a) Bei autotropher Ernährung.

Nach den meisten der bisher vorliegenden Untersuchungen soll das Calcium für die niederen Grünalgen [Protococcaceen, Molisch (1894), Benecke (1898), Loew (1925), Pringsheim (1926)] nicht nötig sein, während die höheren Formen (Zygnemaceen) kalkbedürftig sind. Auch die mit *Chlorella* sich befassenden Forscher (s. Einleitung), die teilweise die verhältnismäßig unreine Glukose benutzten, sind von der Entbehrlichkeit des Calciums überzeugt. Dagegen machte Pirson (1937) auf die Möglichkeit einer Bedeutung des Calciums für *Chlorella* aufmerksam. Auch Warén (1936) vermutet, daß Algen, die auf Ca-Zusatz nicht reagieren, in Wirklichkeit solche sein können, die mit ganz geringen Ca-Mengen auskommen können. So fand er bei *Eremosphaera viridis* in Versuchen mit Quarzgefäßen, daß 0,002% Calciumchlorid zur Zellvermehrung unbedingt nötig sind und hatte schon vorher (1933) für die Desmidiacee *Micrasterias rotata* die Ca-Bedürftigkeit festgestellt. Ganz neuerdings bemerken Mast und Pace (1939) an Hand von Versuchen mit *Chilomonas Paramaecium*, daß alle bisherigen Befunde an Pilzen und Algen, die auf Entbehrlichkeit des Calciums hindeuten, fraglich sind, da Spuren dieses Elements nicht ausgeschlossen worden waren. Dasselbe vermutet Mann (1932) hinsichtlich des Calciumbedarfs von *Aspergillus niger*.

Die hier angewandte Methode erlaubte den Nachweis, daß *Chlorella* so stark auf Calcium reagiert, daß schon geringe Staubmengen zur Befriedigung des Calciumbedarfs genügen.

Bei dem folgenden Versuch in Quarzkolben wurde der Calciumgehalt mittels $Ca(NO_3)_2$ der Stammlösung nach unten vari-

iert. Jeder Kultur war gemäß den obigen Erfahrungen 200 γ Zink als Zinksulfat pro Liter zugesetzt.

1. Stammnährlösung mit $1 \cdot 10^{-3}$% Ca (normale Ca-Menge).
2. ,, ,, $1 \cdot 10^{-5}$% Ca.
3. ,, ,, $1 \cdot 10^{-7}$% Ca.
4. ,, ohne Ca.

$p_H = 5{,}8$.

Der Versuch (Abb. 9) ergab, daß die Wirkung des Calciums auf das Wachstum von *Chlorella* noch stärker ist als die des Zinks. Bezogen auf 150 ccm Nährlösung beträgt die optimale Zinkmenge 26—30 γ, die fast optimale Calciummenge 0,15 γ. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, daß die letzten Calciumspuren schwieriger als die letzten Zinkspuren zu entfernen sind.

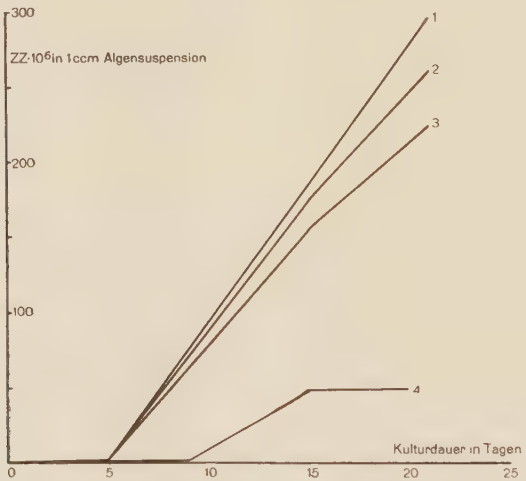

Abb. 9. Kulturen in Stammnährlösung + optimaler Zinkmenge: Nr. 1 + $1 \cdot 10^{-3}$% Ca; Nr. 2 + $1 \cdot 10^{-5}$% Ca; Nr. 3 + $1 \cdot 10^{-7}$% Ca; Nr. 4 ohne Ca.

Dieser Schluß ist auch daraus zu ziehen, daß calcium»freie« Kulturen im Gegensatz zu zinkfreien (Abb. 6) immerhin noch ein gewisses Wachstum erlauben.

Auch wird der Calciummangel viel schwerer als Zinkmangel ertragen. Läßt man eine Kultur längere Zeit unter Calciummangel leiden, so kann sie im Gegensatz zu den in Abb. 3 dargestellten Zinkmangelkulturen mit nachträglichem Zinkzusatz

auf nachfolgende Calciumgabe, bzw. nach Überführen in Neutralglas, nicht mehr mit vollem Wachstum reagieren oder wächst nur sehr langsam nach, wie folgender Versuch in Quarzkolben zeigt (Abb. 10), bei dem der Nährlösung jeweils 200 γ Zink als Zinksulfat pro Liter zugesetzt worden war:

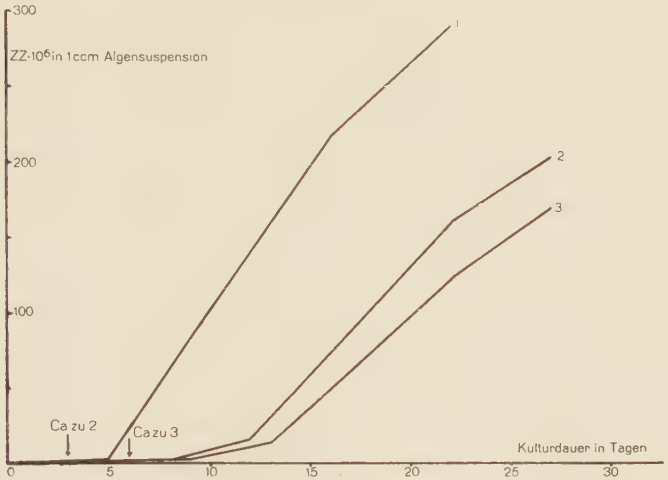

Abb. 10. Wirkung nachträglichen Calciumzusatzes zur zinkhaltigen Stammnährlösung ohne Ca bei $p_H = 5{,}8$. Nr. 1 Kontrolle mit Ca; Nr. 2 Calciumzusatz 3 Tage nach dem Impfen; Nr. 3 Calziumzusatz 6 Tage nach dem Impfen.

1. Stammnährlösung ohne Calcium.
2. „ „ „ , 3 Tage nach Beimpfung $+ 1 \cdot 10^{-3}$ % Ca.
3. „ „ „ , 6 Tage nach Beimpfung $+ 1 \cdot 10^{-3}$ % Ca.

$p_H = 5{,}8$.

Ein ähnlicher Versuch wurde bei $p_H = 7$ durchgeführt, da in neutraler Nährlösung das Anwachsen bei Calciummangel besonders stark verzögert wird und damit auch der Calciumzusatz hinausgeschoben werden konnte. Die Verzögerung im Anwachsen war noch stärker ausgeprägt (Abb. 11), wobei an die p_H-Unabhängigkeit der Zinkwirkung zu erinnern ist.

Im nächsten Versuch wird gezeigt, daß bei Calciummangelkultur Neutralglas als Calciumspender völlig ausreicht; außer-

dem enthält die Versuchsreihe zwei Zinkmangelkulturen, da ja Neutralglas auch als Zinkspender fungiert (Abb. 12).

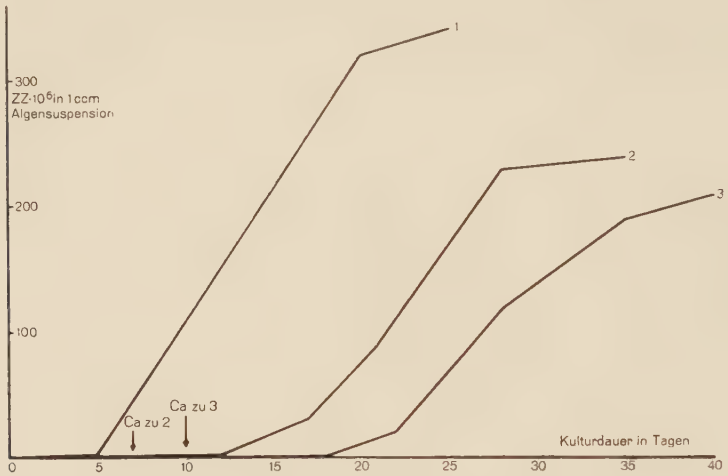

Abb. 11. Wie Abb. 10 bei $p_H = 7{,}0$. Calciumzusatz bei Nr. 2 nach 7 Tagen, bei Nr. 3 nach 10 Tagen.

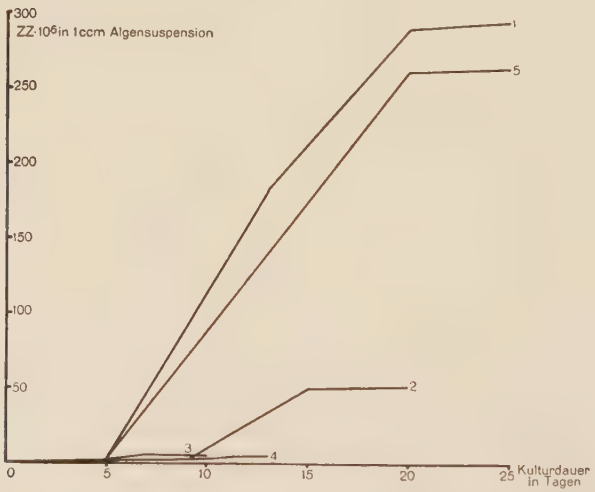

Abb. 12. Calciumwirkung bei $p_H = 5{,}8$ in Quarz und in Neutralglas. Nr. 1 Nährlösung mit optimalem Calcium- und Zinkzusatz in Quarz; Nr. 2 mit optimalem Zinkzusatz ohne Calcium in Quarz; Nr. 3 mit optimalem Calziumzusatz ohne Zink in Quarz; Nr. 4 ohne Calcium und ohne Zink in Quarz; Nr. 5 ohne Calzium und ohne Zink in Neutralglas.

1. Stammnährlösung + 200 γ Zn/Liter mit Calcium in Quarz.
2. ,, + 200 γ Zn/Liter ohne Calcium in Quarz.
3. ,, ohne Zink mit Calcium in Quarz.
4. ,, ohne Calcium und ohne Zink in Quarz.
5. ,, ohne Calcium und ohne Zink in Neutralglas.

Die Alge zeigte in dem 0,5% CaO enthaltenden Neutralglas bei »Calciummangel« normales Wachstum wie in Quarz bei Calciumgegenwart in der Nährlösung, während die Calcium- bzw. Zinkmangelkulturen in Quarz nur kümmerlich wuchsen. Ebenso war der relative Chlorophyllgehalt im Versuch mit Neutralglas normal. Immerhin war das Wachstum bei Calciummangel in Gegenwart von Zink (Vers. Nr. 2) etwas besser als bei Zinkmangel in Gegenwart von Calcium (Vers. Nr. 3). Entweder rührt dies, wie schon oben erwähnt, von der Nichtentfernbarkeit der letzten Calciumspuren her oder ist das Calcium durch andere Ionen zum Teil ersetzbar. So wird nach Warén (1933, 1936) Calciummangel von *Micrasterias* und *Microspora* in Gegenwart von Mangan besser ertragen. Auch darf vielleicht die von Lohmann und Cheng (1940) gefundene Ersetzbarkeit des Magnesiums durch Mangan bei *Phycomyces* auf das Calcium übertragen werden.

Auf alle Fälle zeigt dieser Befund erneut, daß bei derartigen Versuchen unbedingt in Quarzkolben gearbeitet werden muß, weshalb viele frühere Untersuchungen einer Nachprüfung bedürfen. Auch das von Pringsheim (1926) und vielen anderen vor und nach ihm benutzte Jenaer Geräteglas 20, sowie das in Amerika verwandte Pyrexglas [Hopkins (1930), Trelease und Selsam (1939) u. a.] enthalten Calcium (1,15% bzw. 0,3% CaO; s. Hdwb. d. Nat. Wiss. 2. Aufl. 1934, Bd. V).

Der folgende Versuch (Abb. 13) zeigt die Anwachsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom p_H-Wert bei Calciummangel mit und ohne Zinkzusatz in Quarz (Calcium und Zink in optimalen Mengen zugesetzt):

I. $p_H = 4{,}5$; — Ca, — Zn
— Ca, + Zn

II. $p_H = 5{,}8$; — Ca, — Zn
— Ca, + Zn

III. $p_H = 7{,}0$; — Ca, — Zn
— Ca, + Zn

IV. $p_H = 4{,}5$; + Ca, — Zn
$p_H = 5{,}8$
$p_H = 7{,}0$. + Ca, + Zn

Ganz eindeutig zeigt sich bei $p_H = 5{,}8$ eine geringere Empfindlichkeit gegen Calciumentzug als bei den darüber oder darunter liegenden p_H-Werten. Auch ergab sich trotz Unregelmäßigkeiten, die in den wiederholt durchgeführten Versuchen auftraten, im allgemeinen, daß Zinkzusatz bei den unter und über $p_H = 5{,}8$ liegenden $H^{\cdot}$-Konzentrationen ein rascheres Anwachsen als bei Zinkmangel ermöglicht, während bei $p_H = 5{,}8$ kein Unterschied besteht. Bei $p_H = 7$ kam es wiederholt vor, daß die Ca-freien Kulturen überhaupt nicht anwuchsen.

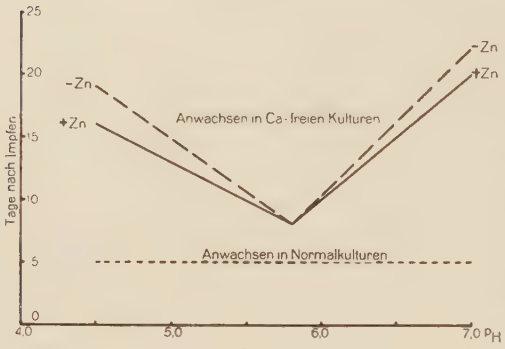

Abb. 13. p_H-Abhängigkeit des Anwachsens Ca-freier Kulturen mit und ohne Zinkzusatz im Vergleich zu Normalkulturen.

Infolge dieser Beschleunigung des Anwachsens von Calciummangelkulturen durch Zinkzusatz wurde versucht, die Frage einer Ersetzbarkeit des Calciums durch Zink, und zwar durch große Zinkmengen, gegen die, wie oben gezeigt, *Chlorella* ziemlich resistent ist, anzugehen. Jedoch ergaben erhöhte Zinkgaben keine Wachstumssteigerung in Calciummangelkulturen, auch nicht bei Variieren des p_H-Wertes (4,5; 5,8; 7,0).

In Tab. 10 wird die Wirkung des Calciummangels mit und ohne Zinkzusatz auf die greifbaren Einzelleistungen in Quarzkulturen wiedergegeben. Calcium und Zink wurden jeweils in optimalen Mengen zugesetzt.

Tabelle 10.

	1	2	3	4
	+ Ca + Zn	+ Ca — Zn	— Ca — Zn	— Ca — Zn
ZZ · 10^6 in 1 ccm . . .	305	5,0	68	4,8
Trockengewicht in 1 ccm	1790 γ	95 γ	510 γ	93 γ
Chlorophyll in 1 ccm .	34 γ	0,9 γ	8,5 γ	0,8 γ
Chloroph./γ Trockengew.	0,0190 γ	0,0094 γ	0,0167 γ	0,0086 γ
p_H Anfang	6,9	6,9	6,9	6,9
p_H Ende	7,6	7,0	7,2	7,0
Kulturdauer in Tagen .	22	10	30	28

Temperatur = 20—22°.

Besonders hervorzuheben ist, daß bei Calciummangel nicht die bei Zinkmangel schon oben und nochmals hier festgestellte Disproportionierung im Chlorophyllgehalt auftritt, da durch Calciummangel der auf das Trockengewicht bezogene Gehalt an Chlorophyll nicht wesentlich vermindert wird, während Zinkmangel sowohl in calciumhaltigen, als in calciumfreien Kulturen eine Verringerung des relativen Chlorophyllgehalts auf die Hälfte zur Folge hatte.

Dieselbe Erscheinung ergab sich bei Calciummangelkulturen mit nachfolgendem Calciumzusatz. Tab. 11 zeigt die Endwerte einer 18 Tage alten, zum Wachstumsstillstand gekommenen calciumfreien Kultur und die entsprechenden Werte nach Calciumzugabe bei jeweiliger Gegenwart der optimalen Zinkmenge. Abb. 14 zeigt diese Verhältnisse im Vergleich zu der Abb. 8, die den entsprechenden Versuch für Zink wiedergibt. Die Nichtbeeinflußbarkeit des relativen Chlorophyllgehalts durch Calcium erhärtet den oben mitgeteilten Befund einer mehr oder weniger spezifischen Wirkung des Zinks auf die Chlorophyll- bzw. Chloroplastenbildung, um so mehr, als die Calciummangelkulturen verhältnismäßig spät mit Calcium versetzt wurden.

Tabelle 11.

18 Tage alte Ca-Mangelkultur mit optimaler Zn-Gabe.

	Kontrolle		Versuch: normale Ca-Zugabe		
	Versuchs-Beginn	Ende	Versuchs-Beginn	24 Std. nach Ca-Zugabe	48 Std. nach Ca-Zugabe
ZZ · 10^6 in 1 ccm . . .	48	46	49	65	84
Trockengewicht in 1 ccm	370 γ	374 γ	376 γ	460 γ	590 γ
Chlorophyll in 1 ccm .	3,8 γ	3,7 γ	3,7 γ	5,5 γ	8,2 γ
Chloroph./γ Trockengew.	0,0103 γ	0,0099 γ	0,0099 γ	0,0122 γ	0,0139 γ
p_H-Wert	6,2	6,2	6,2	6,25	6,3
Temperatur = 20—22°.					

b) Bei mixotropher Ernährung.

Obwohl die angewandte Glukose keiner besonderen Reinigung unterzogen worden war, ließen sich bei $p_H = 4{,}5$ und 7,0 dieselben Wirkungen des Calciumentzugs wie in anorganischer Nährlösung feststellen. Auch waren die Verzögerungen im Wachstum durch Calciumentzug in zinkfreien Nährlösungen stets größer als

bei Zinkgegenwart. Ein nachträgliches Aufholen der Calciummangelkulturen fand nicht statt; sie blieben auf einer sehr deutlichen Mangelstufe stehen. Immerhin waren die in glukosehaltiger Nährlösung erzielten Calciummangelerscheinungen bei Zinkgegenwart nicht so ausgeprägt wie in anorganischer Nährlösung.

8. Versuche mit Mangan.

Schon weiter oben wurde die Vermutung ausgesprochen, daß das Anwachsen in den calciumfreien Kulturen vielleicht nur auf Grund des Mangangehalts der Nährlösung stattfinden könnte. Wenn auch die weitere Untersuchung des Mn : Ca-Antagonismus für später vorbehalten bleibt, so berechtigen daraufhin angestellte Versuche zu dem Schluß, daß wenigstens zum Teil das Mangan den *Chlorella*-Organismus vor Schäden durch Calciummangel schützen kann, wie dies auch Warén (1933, 1936) fand. Wir konnten in verschiedenen Fällen beobachten, daß nachträgliche Manganzugabe (20—50 γ $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$) zu schon zum Stillstand gekommenen calciumfreien, aber Zn-haltigen Kulturen noch eine 100proz. Vermehrung bewirkte. Diese Vermehrung ist aber doch, gemessen an unseren dichten Massenkulturen, verhältnismäßig gering, so daß von einem vollkommenen Ersatz des Calciums durch Mangan hier ebensowenig wie bei Warén gesprochen werden kann. Eine Verunreinigung des Mangansalzes durch Calcium war ausgeschlossen, da ja zu allen Versuchen das mehrere Male umkristallisierte Mangansalz benutzt wurde.

Ob ein früheres Anwachsen der calciumfreien Kulturen (vor allem bei $p_H = 4{,}5$ und 7,0) durch erhöhten Mn-Zusatz erzielt werden kann, muß noch offen bleiben, da nur wenige Versuche angestellt werden konnten. Immerhin kann behauptet werden, daß sich die zweiwertigen Ionen (Ca durch Mn oder Zn) bis zu einem gewissen Grade untereinander ersetzen lassen.

9. Der Einfluß von Glaskolben auf die Kultur von *Chlorella*.

Obwohl die Beeinflussung des Wachstums durch Glasgefäße schon hinreichend bekannt ist und besonders durch Lappalainen (1919) für *Aspergillus* untersucht wurde, mögen hier infolge der

Nichtbeachtung dieser Befunde seitens zahlreicher Autoren einige Erfahrungen mit *Chlorella*-Kulturen in Neutralglas mitgeteilt werden.

Die fortlaufende Reinigung der Neutralglaskolben mit Chromschwefelsäure führte im Lauf der Kolbenbenutzung zu einer deutlichen Verarmung an Spurenelementen, soweit es sich um ihre physiologisch verwertbare Form handelt. Die Mangelerscheinungen machen sich allerdings erst nach einer anfänglichen Periode des Anwachsens vom etwa 12.—15. Tag an bemerkbar.

Mit einer calcium- und zinkfreien Nährlösung wurde folgender Versuch angesetzt:

1.) Fabrikneue Kolben; 2.) 6 Monate benutzte Kolben; 3.) zwei Jahre benutzte Kolben (20—30mal benutzt).

Tabelle 12.

	1	2	3
ZZ · 10^6 in 1 ccm	270	170	110
Zellvolumen in 1 ccm	6,9 cmm	5,2 cmm	3,4 cmm
Chlorophyll in 1 ccm	29 γ	18 γ	11,5 γ
Chlorophyll/Zellvolumen . . .	4,2 γ	3,5 γ	3,4 γ
p_H Anfang	5,8	5,8	5,8
p_H Ende	6,5	6,35	6,15
Kulturdauer in Tagen	20	17	12
Temperatur	21—23°	22—23,5°	21,5—23,5°

Kulturen von der Art wie Nr. 3 in Tab. 12 zeigen deutliche Chlorose und zeigen auch bei langem Stehenlassen keine weitere Vermehrung.

Besprechung.

Die in der vorliegenden Untersuchung angewandte Methode erlaubt es, folgende Elemente als für *Chlorella* lebenswichtig zu bezeichnen: C, H, O, N, P, S, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn. Von dem Natriumgehalt der angewandten Nährlösung ist dabei abgesehen. Sollten Bor, Kupfer und andere Elemente ebenfalls von Bedeutung sein, dann nur in solch geringen Mengen, die mittels der hier angewandten, weit getriebenen Reinigungsmethode nicht ausgeschlossen werden können. Immerhin ist zu bemerken, daß

für optimales Wachstum Zink sich in etwa 10fach größerer Menge nötig erwies, als sie in einem Zusatz der Hoagland-Lösung gegeben ist, die dieselbe Substanzproduktion ermöglicht. Man kann daher an einen Synergismus zwischen Zink und irgendwelchen Bestandteilen der Hoagland-Lösung denken oder auch daran, daß in dem nicht besonders gereinigten Eisenglyzerinphosphat noch allerkleinste Spuren wirksamer Elemente sich befanden.

Eindeutig ergab sich, daß Zink für *Chlorella* ein lebenswichtiges Spurenelement darstellt und ebenso das Calcium, das in noch geringerer Menge als Zink benötigt wird. Damit bestätigen sich die schon geäußerten Vermutungen, daß für die niederen Pflanzen das Calcium nicht entbehrlich ist, jedoch nur in kleinen Mengen benötigt wird. Jedoch arbeiteten die Autoren, die dem Calciumproblem seit Molisch (1894) und Benecke (1898) ihren Stempel aufdrückten, mit Glasgefäßen, die, wie in vorliegender Untersuchung klar erwiesen wird, zur normalen Belieferung der *Chlorella* mit Calcium völlig ausreichen und deren Vorgeschichte für die Ergiebigkeit der Calciumabgabe von derselben Bedeutung ist, wie für die schon bekannte Ergiebigkeit der Abgabe von Zink. Pringsheim (1926) arbeitete mit Jenaer Glas, das er irrtümlicherweise als calciumfrei bezeichnete und fand zwei *Chlorella*-Spezies als unempfindlich gegen Calciummangel, während er andere Arten als mehr oder weniger calciumbedürftig erfand. Die daraufhin von ihm aufgestellten drei Gruppen von Algen werden wohl keine Realität besitzen, sondern in den Zufälligkeiten, wie sie die Verwendung von Glaskolben, und zwar ohne Berücksichtigung ihrer Vorgeschichte mit sich bringt, ihren Ursprung gefunden haben. Wenn neuerdings Trelease und Selsam (1939) Calcium für *Chlorella* als entbehrlich betrachten, so liegt dies einmal daran, daß sie mit Glas, mit dem calciumhaltigen Pyrexglas, arbeiteten, aber auch daran, daß sie die Auswertung der Kulturen schon am 4. Tag nach der Impfung vorgenommen hatten, zu der außerdem tausendmal mehr Zellen als in der vorliegenden Arbeit zur Verwendung gelangten. Auch war ihre Nährsalzkonzentration sehr hoch.

Naturgemäß sind es dieselben Gründe, die bisher die Frage des Zinkbedürfnisses für *Chlorella* unentschieden ließen.

Von den beiden hier untersuchten Spurenelementen wirkt das Zink spezifischer als das Calcium. Dies ergibt sich einmal aus der starken Förderung der Chlorophyll- bzw. Chloroplastenbildung durch Zink, die beim Calcium fehlt, wie auch daraus, daß Zinkmangelkulturen eine höhere Toleranz gegen Zinkmangel als Calciummangelkulturen gegen Calciummangel besitzen und nach Zinkzusatz eine raschere Erholung als nach Calciumzusatz bei den diesbezüglichen Mangelkulturen eintritt. Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß die Funktion des Zinks enger begrenzt ist als die des Calciums. Es liegen hinreichend fermentchemische Erfahrungen vor, durch die außer für Eisen, Mangan und Magnesium auch für das Zink die Mitwirkung an lebenswichtigen Fermentreaktionen sichergestellt ist [z. B. Lohmann und Kossel (1939)] und Szent Györgyi (1938) fragt sich, »ob die scharfen Kraftfelder, die ein Metallatom umgeben und es befähigen, organische Moleküle zu binden und zu polarisieren, nicht viel weitgehender als bisher gedacht wurde, in der Natur als Wirkungsgruppen von Fermenten herangezogen werden«.

Über die Beteiligung des Calciums an Fermentsystemen sind, soweit ersichtlich, noch keine exakten Grundlagen vorhanden. Immerhin steht nichts im Wege, auch diesem Element eine derartige Funktion zuzuschreiben, nachdem von Lohmann (1931) das Magnesium als ein Bestandteil des Enzymsystems für die Phosphorylierung, also eines Vorgangs, der der Zelle grundsätzlich eigen ist, erkannt wurde. Auch zeigten in allerletzter Zeit Lohmann und Cheng (1940), daß die von Lohmann früher nachgewiesene Mitwirkung des Magnesiums und Mangans bei zahlreichen lebenswichtigen Enzymreaktionen sich mengenmäßig im Magnesium- bzw. Manganbedarf von *Phycomyces* wiederfindet. Dabei ist bemerkenswert, daß der von Lohmann und Cheng festgestellte Magnesiumbedarf von *Phycomyces* mit 0,1 γ Magnesium zu 40 ccm Nährlösung größenordnungsmäßig dem hier ermittelten Calciumbedarf von *Chlorella* mit 0,15 γ Ca zu 150 ccm Nährlösung entspricht. Vielleicht liegt es nur an der Schwierigkeit der Calciumentfernung, daß eine Funktion dieses Elements bei Fermentvorgängen noch nicht erkannt worden ist, da diese, soweit ersichtlich, regelmäßig in Glas angestellt wurden, wie

auch übrigens Lohmann und Cheng ihre Kulturversuche mit *Phycomyces* nicht in Quarzkolben vorgenommen haben.

Selbstverständlich soll die viel diskutierte Frage der Calciumfunktion nicht ausschließlich als ein Problem der Fermentchemie betrachtet werden. Dies ist ja auch nicht beim Magnesium möglich, das in grünen Pflanzen auch als Bestandteil des Chlorophylls auftritt. Auch sei hier nochmals an die im Vergleich zum Zink weniger spezifische Wirkung des Calciums auf *Chlorella* erinnert. In diesem Zusammenhang ist es vielleicht von Bedeutung, daß im sauren Bereich unterhalb $p_H = 5{,}8$ Calciummangel das Wachstum stärker verzögert als bei dem genannten p_H-Wert, wie dies schon Pirson (1937) bei Verwendung nicht hochgereinigter Chemikalien fand. Es dürfte sich hier um einen Antagonismus zwischen Calcium- und Wasserstoffionen handeln. Allerdings berichtet Mevius (1927) über Versuche an Wurzeln von *Pinus pinaster*, denen gegenüber Calciumchlorid bei saurer Reaktion vielleicht schädlich ist. Wenn andererseits bei p_H-Werten über 5,8 Calciummangel wiederum eine relative Verzögerung des Anwachsens bewirkt, so könnte dies damit zusammenhängen, daß die letzten Spuren der auch bei Calciummangel noch vorhandenen Calciumsalze mit steigender Alkalität in ihrer elektrolytischen Dissoziation herabgedrückt und damit wirkungslos werden, so daß diese Erscheinung über die Funktion des Calciums nichts aussagen kann.

Die vorliegende Arbeit wurde in den Jahren 1937 bis Herbst 1939 ausgeführt. Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Kurt Noack, danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und deren weitgehende Förderung, auch durch Bereitstellung von Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Ferner gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. A. Pirson für seine Unterstützung und wertvollen Ratschläge.

Berlin, Pflanzenphysiologisches Institut der Universität
April 1940.

Zusammenfassung.

1. Für das Wachstum von *Chlorella vulgaris* var. *pyrenoidosa* sind hochgereinigte Nährlösungen in Quarzgefäßen mit N, P, S, K, Na, Ca, Mg, Mn und Fe unzulänglich.

2. Die Nährlösung wird durch Zusatz der Hoagland-A-Zusatzlösung vollständig.

3. Der entscheidende Faktor der Hoagland-Lösung ist im Zink gegeben. Dieses ermöglicht, allein zugesetzt, in Mengen von 30 γ Zn als Zinksulfat zu 150 ccm Nährlösung optimales Wachstum.

4. Bor- oder Kupferzusatz an Stelle des Zinks sind ohne Wirkung. Kupfer wirkt auf *Chlorella* stark giftig.

5. Die Wirkung des Zinks ist p_H-unabhängig.

6. Sie äußert sich primär in einer Förderung der Chlorophyll- bzw. Chloroplastenentwicklung, die der Steigerung der Zellteilung und Substanzproduktion vorausgeht. Zinkmangelkulturen sind chlorotisch.

7. Die Zinkwirkung ist auch bei mixotropher Ernährung vorhanden.

8. Die zu optimaler Substanzbildung nötige Zinkmenge ist größer als dem Zinkgehalt in der optimal wirkenden Menge der Hoagland-A-Lösung entspricht. Somit könnte in der Hoagland-Lösung ein Synergismus zwischen dem Zink und anderen Bestandteilen vorliegen, die an sich keine Wirkung auf das Wachstum von *Chlorella* ausüben.

9. Calcium ist für *Chlorella* lebenswichtig. Optimale Wirkung auf das Wachstum ergab ein Zusatz von 0,15 γ Ca als $Ca(NO_3)_2$ zu 150 ccm calciumfreier Nährlösung. Calcium ist demnach für *Chlorella* Spurenelement mit noch höherem Wirkungsgrad als Zink, wobei allerdings die Schwierigkeit in der Entfernung der letzten Calciumspuren zu berücksichtigen ist.

10. Im Gegensatz zu Zinkmangelkulturen zeigen Calciummangelkulturen keine ausgesprochene Chlorose.

11. Die Calciumwirkung ist im Gegensatz zur Zinkwirkung p_H-abhängig. Die Empfindlichkeit gegen Calciumentzug hat bei $p_H = 5{,}8$ ein Minimum.

12. Der Calciummangel wird durch Zink und auch Mangan

in geringem Ausmaß behoben. Bei $p_H = 5{,}8$ fällt die Wirkung des Zinks auf die Calciummangelerscheinungen weg.

13. Die Zink- bzw. Calciummangelerscheinungen können durch Zink- bzw. Calciumzusatz nachträglich behoben werden. Jedoch wird der Calciummangel schwerer ertragen als der Zinkmangel. Wie Zink- bzw. Calciumzusatz wirkt die Überführung der Mangelkulturen aus Quarz in Neutralglas, das somit als Zink- und als Calciumspender wirkt.

Literaturverzeichnis.

Barnette, R. M., and Warner, J. D. 1935: A response of chlorotic corn plants to the application of zinc sulfate to the soil. Soil Science. **39,** 145—160.

Benecke, W. 1895: Die zur Ernährung der Schimmelpilze notwendigen Metalle. Jahrb. wiss. Bot. **28,** 487—530.

—, 1898: Über Kulturbedingungen einiger Algen. Bot. Ztg. **56,** 83—97.

—, 1907: I. Untersuchungen über den Bedarf der Bakterien an Mineralstoffen. Ebenda. **65,** 1—23.

Bertrand, G., und Andreitschewa, M. 1933: Sur la teneur comparée en zinc des feuilles vertes et des feuilles étiolées. C. R. Acad. Sci. Paris. **197,** 1374—1376.

Bokorny, Th. 1912: Einwirkung von Metallsalzen auf Hefe und andere Pilze. Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. **35,** 118—197.

Bortels, H. 1927: Über die Bedeutung von Eisen, Zink und Kupfer für Mikroorganismen. Biochem. Zeitschr. **182,** 301—358.

Brenchley, W. E., and Warington, K. 1927: The role of boron in the growth of plants. Ann. Bot. **41,** 167—187.

Emerson, R., and Lewis, Ch. M. 1939: Factors influencing the efficiency of Photosynthesis. Amer. Journ. Bot. **26,** 808—822.

Fitting, H. 1927: Untersuchungen über die Chemodinese bei *Vallisneria.* Jahrb. wiss. Bot. **67,** 427—596.

Gollmick, F. 1936: Der Einfluß von Zink, Eisen, Kupfer und deren Kombination auf das Wachstum von *Aspergillus niger.* Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. **93,** 421—442.

Gracanin, M. 1928: Ein Beitrag zur Zinkfrage in der Pflanzenbiochemie. Biochem. Zeitschr. **194,** 215—230.

Green, L. F., Mc Carthy, I. F., and King, C. G. 1939: Inhibition of respiration and photosynthesis in *Chlorella pyrenoidosa* by organic compounds that inhibit copper catalysis. Journ. biol. Chem. **128,** 447—453.

Güntzesco, T., und Peterfi, S. 1936: Über die Wirkung von Mn, Zn, Fe auf die Entwicklung von *Microthamnium Kützingianum* Naeg. Bull. Soc. Chim. Romania. **18,** 177—181. Zit. n. Chem. Zentralbl. 1938.

Hoagland, D. R., and Snyder, W. C. 1933: Nutrition of strawberry plant under controlled conditions: (a) Effects of deficiencies of boron and certain other elements. (b) Susceptibility to injury from sodium salts. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. **30,** 288—294.

Hopkins, E. F. 1930: Iron-ion concentration in relation to the growth and other biological processes. Bot. Gaz. **89,** 209—240.

—, 1934: Manganese an essential element for green plants. Cornell Univ. Agr. Exp. Sta. Memoir. **151,** 1—40.

—, and Wann, F. B. 1926: Relation of hydrogen-ion concentration to growth of *Chlorella* and to the availability of iron. Bot. Gaz. **81,** 353—376.

—, —, 1927: Ironrequirement of *Chlorella*. Ebenda. **84,** 407—427.

Lappalainen, H. 1919: Biochemische Studien an *Aspergillus niger*. Öfvers. Finska Vetenskaps.-Soc. Förhandl. A **62,** 1—84.

Lepierre, Ch. 1913: Sur la non-spécifité du zinc comme catalysateur biologique pour la culture de l'*Aspergillus niger*. Son remplacement par d'autres éléments. C. R. Acad. Sci. Paris. **156,** 258—261.

Loew, O. 1925: Über das Kalkbedürfnis von Algen und Pilzen. Biol. Zentralbl. **45,** 122—125.

Lohmann, K. 1931: Untersuchungen über die chemische Natur des Coferments der Milchsäurebildung. Biochem. Zeitschr. **237,** 445—482.

—, und Kossel, A. J. 1939: Über die Einwirkung des Zinks und anderer Metalle auf die Carboxylase. Nat. wiss. **27,** 595—596.

—, und Cheng, C. T. 1940: Über den Einfluß von Magnesium- und Mangansalzen auf das Wachstum von *Phycomyces*. Ebenda. **28,** 172.

Maier, W. 1938: Die Notwendigkeit des Bors in der Pflanze. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **56,** 84—100.

Mann, M. L. 1932: Calcium and magnesium requirements of *Aspergillus niger*. Bull. Torrey Bot. Club. **59,** 443—490.

Mast, S. O., and Pace, D. M. 1939: The effects of Calcium and Magnesium on metabolic processus on *Chilomonas Paramaecium*. Journ. Cell. and Comp. Physiol. **14,** 261—279.

Mevius, W. 1927: Kalzium-Ion und Wurzelwachstum. Jahrb. wiss. Bot. **66,** 183—253.

Molisch, H. 1894: Die mineralische Nahrung der niederen Pilze. Sitz.-Ber. Akad. Wiss. Wien, math.-naturwiss. Kl. **103,** Abt. I. 554—574.

Pirson, A. 1937: Ernährungs- und stoffwechselphysiologische Untersuchungen an *Fontinalis* und *Chlorella*. Zeitschr. f. Bot. **31,** 193—267.

—, 1940: Stoffwechselphysiologische Analyse des Mineralsalzmangels bei Grünalgen. Ern. d. Pflz. **36,** 25—31.

Pringsheim, E. G. 1926: Über das Ca-Bedürfnis einiger Algen. Planta. **2,** 555—568.

Raulin, J. 1869: Études chimiques sur la végétation. Ann. Sc. Nat. V. Sér. Bot. **11,** 93—299.

Rehm, S. 1937: Der Einfluß der Borsäure auf Wachstum und Salzaufnahme bei *Impatiens balsamina*. Jahrb. wiss. Bot. **85,** 788—814.

Roberg, M. 1928: Über die Wirkung von Eisen-, Zink- und Kupfersalzen auf Aspergillen. Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. **74,** 333—370.

—, 1930: Ein Beitrag zur Stoffwechselphysiologie der Grünalgen. Jahrb. wiss. Bot. **72,** 369—384.

—, 1931: Weitere Untersuchungen über die Bedeutung des Zinks für *Aspergillus niger.* Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. **84,** 196—230.

—, 1932: Ein Beitrag zur Stoffwechselphysiologie der Grünalgen. II. (Über die Wirkung von Eisen-, Zink- und Kupfersalzen.) Jahrb. wiss. Bot. **76,** 311—332.

Sakamura, T. 1936: Über einige für die Kultur von Aspergillen notwendige Schwermetalle und die Befreiungsverfahren der Nährlösung von ihren Spuren. Journ. Fac. Sc. Hokkaido Imp. Univ., Ser. 5. **4,** 99—116.

Scharrer, K., und Schropp, W. 1933: Sand- und Wasserkulturversuche über die Wirkung des Bors auf Keimung und Jugendwachstum einiger Kulturpflanzen. Zeitschr. f. Pflanzenern. **28,** 313—329.

—, 1934: Sand- und Wasserkulturversuche über die Wirkung des Zink- und Kadmium-Ions. Ebenda. **34,** 14—29.

—, 1936: Untersuchungen über die Wirkung der Kieselsäure und des Bors sowie einiger anderer Spurenelemente auf das Wachstum von Erbsen, Acker- und Sojabohnen. Ebenda. **46,** 370—383.

Schmucker, Th. 1935: Über den Einfluß der Borsäure auf Pflanzen, insbesondere keimende Pollenkörner. Planta. **23,** 264—283.

Schramm 1922: Unveröffentlichte Mitteilung; zit. n. Hopkins und Wann, 1926. Bot. Gaz. **81,** 361.

Sommer, A. L., and Lipman, C. B. 1926: Evidence of the indispensable nature of zinc and boron for higher green plants. Plant Physiology. **1,** 231—249.

Steinberg, R. A. 1919: A study of some factors in the chemical stimulation of the growth of *Aspergillus niger.* Amer. Journ. of Bot. **6,** 330—372.

Szent Györgyi, A., und Mitarbeiter 1938: Über die dehydrierende Autoxydation und die biologischen Oxydationen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **254,** 147—164.

Tamiya, H. 1928: Studien über die Stoffwechselphysiologie von *Aspergillus oryzae.* Acta Phytochimica. **4,** 77—214.

Trelease, S. F., and Selsam, M. E. 1939: Influence of calcium and magnesium on the growth of *Chlorella.* Amer. Journ. Bot. **26,** 339—341.

Van Hille, J. C. 1938: The quantitative relation between rate of photosynthesis and chlorophyll content in *Chlorella pyrenoidosa.* Rec. Trav. Bot. Néerl. **35,** 680—757.

Warén, H. 1933: Über die Rolle des Ca im Leben der Zelle auf Grund von Versuchen an *Micrasterias.* Planta. **19,** 1—45.

Waris (Warén), H. 1936: Über das Calciumbedürfnis der niederen Algen. Planta. **25,** 460—470.

Young, R. S. 1935: Certain rarer elements in soils and fertilizers, and their role in plant growth. Cornell Univ. Agr. Exp. Sta. Memoir. **174,** 1—70.

Lebenslauf.

Am 20. Januar 1914 wurde ich, Günther Hermann Johannes Stegmann, als Sohn des Studienrats Harry Stegmann und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Gensch, zu Gütersloh in Westfalen geboren. Nach 4jähriger Grundschulzeit besuchte ich 9 Jahre lang das Gymnasium zu Gütersloh und bestand dort am 22. März 1933 die Reifeprüfung. Daraufhin widmete ich mich bis zum S.-S. 1937 dem Studium der Mathematik und Naturwissenschaften (Biologie, Chemie, Physik) an der Friedrich-Wilhelms-Universität Berlin. Seit dem W.-S. 1936/37 arbeitete ich an meiner Dissertation.

Buchdruckerei F. Mitzlaff, Rudolstadt/Thür.